

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. April 2004 (29.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/035617 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/245

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/010978

(22) Internationales Anmeldedatum:
2. Oktober 2003 (02.10.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 47 437.0 11. Oktober 2002 (11.10.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): CONSORTIUM FÜR ELEKTROCHEMISCHE INDUSTRIE GMBH [DE/DE]; Zielstattstrasse 20, 81379 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LEONHARTS-BERGER, Susanne [DE/DE]; Frundsbergstrasse 12, 80634 München (DE). PFEIFFER, Kerstin [DE/DE]; Heiterwanger Strasse 32, 81373 München (DE). WINTERHALTER, Christoph [DE/DE]; Keltenstrasse 27, 82343 Pöcking (DE). BAUER, Brigitte [DE/DE]; Zieblandstrasse 39, 80798 München (DE).

(74) Anwälte: POTTEN, Holger usw.; Wacker-Chemie GmbH, Zentralbereich PML, Hanns-Seidel-Platz 4, 81737 München (DE).

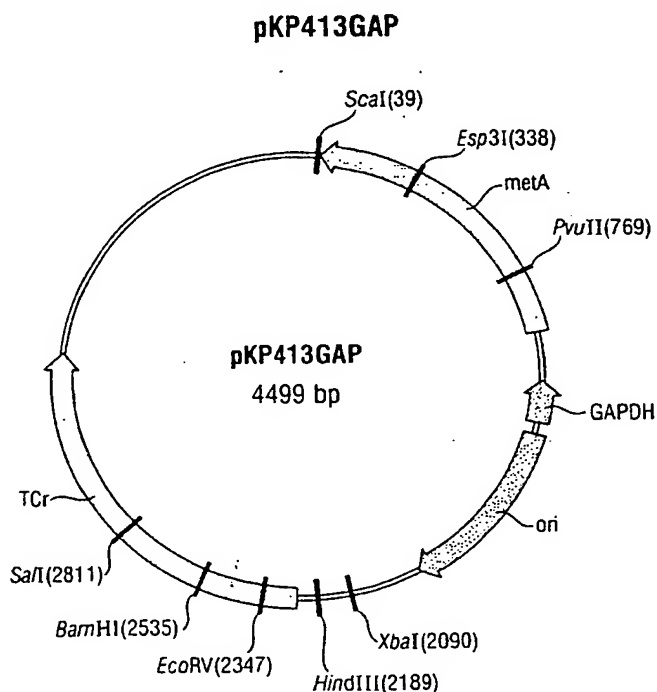
(81) Bestimmungsstaaten (national): CA, CN, JP, RU, US.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: FEEDBACK-RESISTANT HOMOSERINE TRANSSUCCINYLASES

(54) Bezeichnung: FEEDBACK-RESISTENTE HOMOSERIN-TRANSSUCCINYLASEN



(57) Abstract: The invention concerns a homoserin transsuccinylase having at least one mutation compared to a wild-type homoserine transsuccinylase and reduced sensitivity towards L-methionine or SAM, compared to the wild-type enzyme. The latter comprises an amino acid sequence including a partial AspGlyXaaXaaXaaThrGlyAlaPro sequence between position 90 and position 115 and a partial TyrGlnXaaThrPro sequence between position 285 and position 310, position 1 of the amino acid sequence corresponding to the initial methionine. The invention is characterized in that the mutation is a substitution of the aspartate in the partial AspGlyXaa-XaaXaaThrGlyAlaPro sequence, or a substitution of the tyrosine in the partial TyrGlnXaaThrPro sequence.

(57) Zusammenfassung: Homoserin-Transsuccinylase, die im Vergleich zu einem Homoserin-Transsuccinylase-Wildtyp-Enzym mindestens eine Mutation aufweist und eine im Vergleich zu dem Wildtyp-Enzym reduzierte Sensitivität gegenüber L-Methionin oder SAM zeigt, wobei das Wildtyp-Enzym eine Aminosäuresequenz besitzt, die eine Teilsequenz AspGlyXaaXaaXaaThrGlyAlaPro zwischen Position 90 und 115 und eine Teilsequenz TyrGlnXaaThrPro zwischen Position 285 und 310 umfasst, wobei Position 1 der Aminosäuresequenz das Start-methionin ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Mutation ein Aminosäureaustausch des Aspartats in der Teilsequenz AspGlyXaa-XaaXaaThrGlyAlaPro, oder ein Aminosäureaustausch des Tyrosins in der Teilsequenz TyrGlnXaaThrPro ist.



Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Feedback-resistente Homoserin-Transsuccinylasen

Die vorliegende Erfindung betrifft feedback-resistente Homoserin-Transsuccinylasen, Mikroorganismenstämme enthaltend diese Enzyme sowie ihre Verwendung zur Herstellung von L-Methionin oder S-Adenosylmethionin.

Methionin ist eine für den Menschen und für viele Tiere essentielle Aminosäure. Sie wird vor allem für den Futtermittelmarkt produziert und als Racemat dem Tierfutter zugesetzt. Die Synthese erfolgt chemisch aus Acrolein und Methanthiol über 3-(Methylthio)-propionaldehyd, der mit Blausäure, Ammoniak und Kohlendioxid über ein Hydantoin in D,L-Methionin überführt wird. Eine Racemattrennung kann enzymatisch erfolgen.

S-Adenosylmethionin (SAM) ist der wichtigste Methylgruppen-donor im Stoffwechsel und findet im Pharmabereich Verwendung bei der Behandlung von Depressionen, Erkrankungen der Leber und Arthritis. Beschriebene Verfahren zur SAM-Herstellung umfassen vor allem die Anzucht von Hefen (Schlenk F. und DePalma R.E., J. Biol. Chem. 1037-1050 (1957), Shiozaki S. et al., Agric. Biol. Chem. 53, 3269-3274 (1989)) in Gegenwart der Vorstufe L-Methionin und die chromatographische Aufreinigung nach Autolyse.

Die mikrobielle Synthese von Methionin wurde besonders intensiv im Bakterium E. coli untersucht (Greene, R.C., Biosynthesis of Methionine in: Neidhardt F.C., Escherichia coli and Salmonella typhimurium, Cellular and molecular biology, Second Edition, ASM Press, Washington DC (1996), Seiten 542-560 und darin enthaltenen Referenzen). Sie besteht aus einer Reihe von durch Enzyme katalysierten Reaktionen und ist streng reguliert. Die ersten Schritte der Synthese ausgehend von Aspartat bis zu Homoserin verlaufen für die Bildung der Aminosäuren Threonin, Leucin, Isoleucin und Valin parallel. Der erste für die Methioninsynthese spezifische Schritt ist die Bildung von O-Succinyl-Homoserin aus Succinyl-CoA und Homoserin unter Abspaltung von Coenzym A. Diese Reaktion wird durch das Enzym

Homoserin-Succinyltransferase (Homoserin-O-Transsuccinylase, MetA, EC 2.3.1.46) katalysiert. Die Synthese von SAM erfolgt in einem Schritt aus L-Methionin und ATP.

5 Die Aktivität der Homoserin-Transsuccinylase ist in Gegenwart von L-Methionin und/oder SAM gehemmt (Lee L.-W. et al., J. Biol. Chem. 241, 5479-5480 (1966)). Diese Endprodukthemmung verhindert einerseits im Bakterium eine überschüssige, energie-
10 verbrauchende Synthese von Methionin und SAM, steht andererseits jedoch auch einer mikrobiellen Produktion dieser beiden Substanzen im industriellen Maßstab im Weg. Das für die Homoserin-Transsuccinylase codierende Gen besteht aus 930 (inklusive Stopcodon) Basenpaaren, das davon codierte Protein aus
15 309 Aminosäuren. Bisher wurde die Struktur der Homoserin-Transsuccinylase nicht aufgeklärt und daher ist auch eine Identifizierung der an einer Endprodukthemmung beteiligten Aminosäuren nicht möglich.

Eine bekannte Methode, die Synthese von Stoffwechselendprodukten zu verstärken ist die Verwendung von veränderten Enzymen, deren Aktivität nicht mehr hemmbar durch das Endprodukt ihres Stoffwechselweges ist (feedback-resistente Mutanten). So wurden beispielsweise feedback-resistente Mutanten der 3-Desoxy-D-Arabinose-7-Phosphat-Synthase für die Steigerung
20 der Synthese von L-Tryptophan und L-Phenylalanin hergestellt (EP0745671A2) und feedback-resistente Mutanten der Chorismat-Mutase/Prephenat-Dehydratase zur Steigerung der Phenylalanin-Produktion erzeugt (US5120837).

30 Vor kurzem wurde das Enzym Homoserin-Transsuccinylase aus E. coli durch Mutation der dafür codierenden DNS-Sequenz dahingehend verändert, dass die entstandenen Proteine eine deutlich verringerte Hemmbarkeit ihrer Aktivität in Gegenwart von 1 mM L-Methionin oder 1 mM SAM aufweisen (JP2000139471A). Es handelt sich dabei um folgende Aminosäureaustausche: Arginin an
35 Position 27 wurde durch Cystein ersetzt, Isoleucin an Position 296 durch Serin und Prolin an Position 298 durch Leucin. Die veränderten Homoserin-Transsuccinylasen zeigten in Gegenwart

von 1 mM L-Methionin Restaktivitäten zwischen 44 und 89%, in Gegenwart von 1 mM SAM zwischen 10 und 73%. Bakterienstämme, die diese veränderten Proteine enthalten, zeigen gesteigerte L-Methionin-Produktion. Jedoch weisen diese veränderten Homoserin-Transsuccinylasen in Abwesenheit von L-Methionin und SAM eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringerte Aktivität auf. Es ist wünschenswert, möglichst viele Varianten der Homoserin-Transsuccinylase, die sich im Grad ihrer Aktivität und im Grad ihrer Hemmbarkeit durch L-Methionin und/oder SAM unterscheiden, zur Verfügung zu haben, da die mikrobielle Biosynthese von L-Methionin und SAM in ihrem Ablauf und ihrer Regulation höchst komplex ist und darüber hinaus vielschichtig mit diversen anderen Stoffwechselwegen in der Zelle vernetzt ist. Daher kann im Voraus keine Vorhersage gemacht werden, mit welcher Variante welcher Effekt auf das Wachstum eines Mikroorganismenstamms, die Balance seiner lebenswichtigen Stoffwechselabläufe und die Produktion von L-Methionin und SAM erzielt werden kann.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein breites Spektrum neuer Varianten der Homoserin-Transsuccinylase (MetA-Protein) zur Verfügung zu stellen, die eine im Vergleich zum Wildtyp (WT) -Enzym erhöhte Feedback-Resistenz hinsichtlich L-Methionin und SAM besitzen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch eine Homoserin-Transsuccinylase die im Vergleich zu einem Homoserin-Transsuccinylase Wildtyp-Enzym mindestens eine Mutation aufweist und eine im Vergleich zu dem Wildtyp-Enzym reduzierte Sensitivität gegenüber L-Methionin oder SAM zeigt, wobei das Wildtyp-Enzyms eine Aminosäuresequenz besitzt, die eine Teilsequenz AspGlyXaaXaaXaaThrGlyAlaPro zwischen Position 90 und 115 und eine Teilsequenz TyrGlnXaaThrPro zwischen Position 285 und 310 umfasst, wobei Position 1 der Aminosäuresequenz das Startmethionin ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Mutation ein Aminosäureaustausch des Aspartats in der Teilsequenz AspGlyXaaXaaXaaThrGlyAlaPro, oder ein Aminosäureaustausch des Tyrosins in der Teilsequenz TyrGlnXaaThrPro ist.

Das Asp in der Teilsequenz AspGlyXaaXaaXaaThrGlyAlaPro und das Tyr in der Teilsequenz TyrGlnXaaThrPro sind bei einem Vergleich von Homoserin-Transsuccinylasen verschiedener Mikroorganismen konserviert. Der das konservierte Aspartat Asp enthaltende Sequenzbereich AspGlyXaaXaaXaaThrGlyAlaPro liegt im MetA-Protein von E. coli zwischen Position 101 und 109 von SEQ ID No. 2. Er befindet sich in anderen MetA-Proteinen im Bereich zwischen Position 90 und 115. Der das konservierte Tyrosin Tyr enthaltende Sequenzbereich TyrGlnXaaThrPro liegt im MetA-Protein von E. coli zwischen Position 294 und 298 von SEQ ID No. 2. Er befindet sich in anderen MetA-Proteinen im Bereich zwischen Position 285 und 310. Xaa bedeutet eine beliebige natürliche Aminosäure.

Bisher ist die räumliche Struktur der Homoserin-Transsuccinylase nicht aufgeklärt. Daher ist die Zuordnung verschiedener Funktionen wie enzymatische Aktivität und Hemmbarkeit durch L-Methionin und/oder SAM zu bestimmten Aminosäuren nicht ermöglicht. Da die Faltung von Proteinen ein äußerst komplexer Vorgang ist, kann aus der Primärsequenz von Proteinen nicht auf eine räumliche Struktur geschlossen werden und es kommt nicht selten vor, dass Aminosäuren, die in der Primärsequenz weit voneinander entfernt sind, im gefalteten Protein in unmittelbarer Nähe liegen und umgekehrt. Überraschend wurde gefunden, dass die erfindungsgemäßen Aminosäureaustausche an Position 101 oder 294 des Proteins zu einer Herabsetzung der Feedback-Hemmbarkeit sowohl gegenüber L-Methionin als auch gegenüber SAM führen.

Eine erfindungsgemäße Homoserin-Transsuccinylase weist eine im Vergleich zum Wildtyp-Enzym verbesserte Resistenz (also erhöhter K_i) gegenüber den Inhibitoren SAM und/oder L-Methionin auf. Vorzugsweise weist sie eine im Vergleich zum Wildtyp zumindest 2fach erhöhte Resistenz gegenüber Methionin und/oder SAM auf. Besonders bevorzugt besitzt eine erfindungsgemäße Homoserin-Transsuccinylase eine im Vergleich zum Wildtyp 10fach erhöhte Resistenz, insbesondere bevorzugt eine 50fach erhöhte

Resistenz gegenüber Methionin und/oder SAM, ganz besonders bevorzugt eine im Vergleich zu den in JP2000139471A genannten MetA-Mutanten erhöhte Resistenz.

5 Besonders bevorzugt umfasst die Proteinsequenz einer erfindungsgemäßen Homoserin-Transsuccinylase eine der in der Tabelle 1 aufgelisteten Mutationen oder eine Kombination der aufgeführten Mutationen.

10 Eine erfindungsgemäße Homoserin-Transsuccinylase kann beispielsweise durch Expression einer DNS-Sequenz, welche für eine erfindungsgemäße Homoserin-Transsuccinylase codiert, erhalten werden.

15 Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch eine DNS-Sequenz, welche für eine erfindungsgemäße Homoserin-Transsuccinylase codiert.

Eine solche DNS-Sequenz ist erhältlich durch eine Mutation einer Base in einem oder mehreren Codonen eines metA-Gens, dadurch gekennzeichnet, dass im Codon für das konservierte Aspartat, das sich im Wildtyp-Enzym von E. coli an Position 101 befindet, oder im Codon für das konservierte Tyrosin, das sich im Wildtyp-Enzym von E. coli an Position 294 befindet, mindestens eine Mutation vorhanden ist, wobei Codon 1 mit der ersten Base aus Sequenz SEQ ID No. 1 beginnt.

Eine erfindungsgemäße DNS-Sequenz ist ein metA-Gen, bei denen das Codon für das Aspartat Asp in der Sequenz AspGlyXaaXaaXaaThrGlyAlaPro, wobei diese Sequenz im MetA-Protein zwischen Position 90 und 115 liegt, und/oder das Codon für das konservierte Tyrosin Tyr in der Sequenz TyrGlnXaaThrPro, wobei diese Sequenz zwischen Position 285 und 310 liegt, verändert ist.

35 Im Folgenden wird eine erfindungsgemäße DNS-Sequenz als feedback-resistentes metA-Allel bezeichnet.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind als metA-Allele auch solche Gene aufzufassen, die bei einer Analyse mit dem Algorithmus BESTFIT (GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GLG) Madison, Wisconsin) eine Sequenzidentität von größer 50 % zum WT-metA-Gen von E. coli aufweisen. Ebenso sind Proteine mit einer Sequenzidentität von größer 50 % zur Wildtyp-Homoserin-Transsuccinylase von E. coli (Algorithmus BESTFIT, GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GLG) Madison, Wisconsin), die Homoserin-Transsuccinylase-Aktivität besitzen, als Homoserin-Transsuccinylasen aufzufassen.

Vorzugsweise umfasst ein erfindungsgemäßes metA-Allel eine in Tabelle 1, Spalte 2 bzw 4 aufgelistete Mutation oder eine Kombination der aufgeführten Mutationen.

Erfindungsgemäße metA-Allele lassen sich beispielsweise durch unspezifische oder durch gezielte Mutagenese aus im Folgenden beschriebenen Ausgangsmaterial herstellen. Unspezifische Mutationen innerhalb der genannten DNS-Region können zum Beispiel durch chemische Agentien (z. B. 1-Methyl-3-nitro-1-nitroso-guanidin, Ethylmethansulfonsäure u.ä.) und/oder durch physikalische Methoden und/oder durch unter bestimmten Bedingungen durchgeführte PCR-Reaktionen und/oder durch Amplifikation der DNS in Mutatorstämmen (z.B. XL1-Red) erzeugt werden. Methoden zur Einführung von Mutationen an spezifischen Positionen innerhalb eines DNS-Fragmentes sind bekannt. Eine weitere Möglichkeit zur Erzeugung feedback-resistenter metA-Allele besteht in der Kombination verschiedener, zur Feedback-Resistenz führender Mutationen zu multiplen Mutanten mit neuen Eigenschaften.

Als Ausgangsmaterial für die Mutagenese dient vorzugsweise die DNS eines Wildtyp-metA-Gens. Das zu mutierende metA-Gen kann chromosomal oder extrachromosomal codiert sein. Durch Anwendung der vorgenannten Mutagenese-Methoden werden ein oder mehrere Nukleotide der DNS-Sequenz so verändert, dass das nun durch das Gen codierte Protein eine Mutation des konservierten Aspartats, das sich im Wildtyp-Enzym von E. coli an Position

101 befindet, oder eine Mutation des konservierten Tyrosins, das sich im Wildtyp-Enzym von E. coli an Position 294 befindet, aufweist, wobei Position 1 das Startmethionin aus SEQ ID NO. 2 ist.

5 Mit den beschriebenen Techniken lassen sich in ein beliebiges metA-Gen eine oder mehrere Mutationen im genannten DNS-Bereich einführen. Diese Mutationen bewirken, dass die codierte Homoserin-Transsuccinylase eine zur Feedback-Resistenz gegenüber
10 SAM und/oder L-Methionin führende Aminosäuresequenz besitzt.

Im Anschluss an die beispielsweise wie beschrieben durchgeführte Mutagenese erfolgt die Selektion der Mutanten mit dem gewünschten Phänotyp beispielsweise durch Bestimmung des Ausmaßes der L-Methionin- und/oder SAM-Sensitivität der mutierten Homoserin-Transsuccinylasen.
15

Für die Bestimmung der L-Methionin- und/oder SAM-Sensitivität der Homoserin-Transsuccinylase kann jede Methode benutzt werden, die es erlaubt, die Aktivität des Enzyms in Anwesenheit von L-Methionin oder SAM zu bestimmen. Beispielsweise kann die Bestimmung der Homoserin-Transsuccinylase-Aktivität in Anlehnung an die von Kredich und Tomkins beschriebene Methode zur Bestimmung der Aktivität von Serin-Acetyltransferasen (Kredich
20 N.M. und Tomkins G.M., J. Biol. Chem. 241, 4955-4965 (1966)) erfolgen. Die Enzymaktivität wird in einem Ansatz, der Homoserin und Succinyl-CoA enthält, gemessen. Die Reaktion wird durch Enzymzugabe gestartet und über die Abnahme der Extinktion bei 232 nm, die durch Spaltung der Thioesterbindung im Succinyl-Coenzym A hervorgerufen wird, in einem Spektralphotometer verfolgt. Der beschriebene Test eignet sich für die Bestimmung der L-Methionin-Sensitivität der Homoserin-Transsuccinylasen. Die Hemmung der Homoserin-Transsuccinylase-Aktivität wird in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen
25 von L-Methionin im Reaktionsansatz getestet. Die katalytische Aktivität der verschiedenen Homoserin-Transsuccinylasen wird in An- und Abwesenheit von L-Methionin bestimmt und daraus die Hemmkonstante K_i ermittelt, welche diejenige Inhibitorkon-
30

zentration beschreibt, bei welcher die Aktivität nur noch 50 % der in Abwesenheit des Inhibitors messbaren beträgt.

Für die Bestimmung der SAM-Sensitivität der Aktivität der verschiedenen Homoserin-Transsuccinylasen kann beispielsweise ein wie in Lee L.W. et al., J. Biol. Chem. 241, 5479-5480 (1966) beschriebener Aktivitätstest erfolgen. Dabei wird der Enzymextrakt mit Homoserin und Succinyl-CoA inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wird ein Teil des Testansatzes durch Zugabe zu einem Gemisch aus Ethanol, Wasser und 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure) gestoppt. Die Absorption wird bei 412 nm photometrisch bestimmt. Der beschriebene Test eignet sich beispielsweise für die Bestimmung der SAM-Sensitivität der Homoserin-Transsuccinylasen. Die Hemmung der Homoserin-Transsuccinylase-Aktivität wird in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von SAM im Reaktionsansatz getestet. Die katalytische Aktivität der verschiedenen Homoserin-Transsuccinylasen wird in An- und Abwesenheit von SAM bestimmt und daraus die Hemmkonstante K_i ermittelt.

In der Regel bevorzugt wird, eine Homoserin-Transsuccinylase mit einer verringerten L-Methionin- und/oder SAM-Sensitivität bei gleichzeitig unveränderter katalytischer Aktivität. Für andere Vorhaben kann eine gleichzeitige Reduzierung der L-Methionin- und/oder SAM-Sensitivität und der katalytischen Aktivität erstrebenswert sein.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Mikroorganismenstämmen, welche erfindungsgemäße feedback-resistente metA-Allele enthalten. Solche Stämme von Mikroorganismen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie einen zumindest durch ein feedback-resistentes metA-Allel deregulierten L-Methionin- bzw. SAM-Stoffwechsel besitzen. Da bei allen Mikroorganismen dieser Stoffwechsel über denselben, an sich bekannten Weg verläuft und die zur Herstellung der erfindungsgemäßen Stämme anzuwendenden Techniken z. B. aus Standardlehrbüchern allgemein bekannt und auf alle Mikroorganismen anwendbar sind, sind erfindungsgemäße Stämme aus beliebigen Mikroorganismen herstellbar.

Bevorzugt geeignet zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Stammes sind Bakterien. Besonders bevorzugt geeignet sind gram-negative Bakterien, insbesondere E. coli.

5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Herstellung von L-Methionin oder SAM durch Kultivierung erfindungsgemäßer Mikroorganismen, außerdem die Verwendung erfindungsgemäßer Mikroorganismen zur Herstellung von Produkten, die Methionin enthalten (wie beispielsweise Methionin-enthaltende Peptide) oder
10 sich im Stoffwechsel der Mikroorganismen von L-Methionin oder SAM ableiten (wie beispielsweise Polyamine, Liponsäure, Biotin und Chinone). Des weiteren können erfindungsgemäße Mikroorganismen, die SAM in im Vergleich zum Wildtyp verstärktem Maße produzieren, dazu verwendet werden, Produkte, die durch Übertragung der Methylgruppe von SAM entstehen, herzustellen.
15

Die feedback-resistenten metA-Allele werden zur Expression des veränderten Homoserin-Transsuccinylase-Enzyms mittels üblicher Verfahren in einen Wirtstamm transformiert.

20

Die Expression eines feedback-resistenten metA-Allels kann unter Kontrolle des eigenen, vor dem metA-Gen lokalisierten Promotors oder durch Verwendung anderer geeigneter Promotorsysteme, die dem Fachmann bekannt sind, erfolgen. Dabei kann sich
25 das entsprechende Gen unter der Kontrolle eines solchen Promotors entweder in einer oder in mehreren Kopien auf dem Chromosom des Wirtsorganismus oder auf einem Vektor, vorzugsweise einem Plasmid befinden. Die Erfindung betrifft daher auch ein Plasmid, dadurch gekennzeichnet, dass es ein erfindungsgemäßes
30 feedback-resistentes metA-Allel mit einem Promotor enthält.

Zur Klonierung können Vektoren verwendet werden, die bereits genetische Elemente (z.B. konstitutive oder regulierbare Promotoren, Terminatoren) enthalten, die entweder eine andauernde
35 oder eine kontrollierte, induzierbare Expression des für eine Homoserin-Transsuccinylase codierenden Gens ermöglichen. Außerdem befinden sich auf einem Expressionsvektor vorzugsweise andere regulatorische Elemente wie ribosomale Bindungsstellen

und Terminationssequenzen sowie Sequenzen, die für selektive Marker und/oder Reporter-Gene codieren. Die Expression derartiger Selektionsmarker erleichtert die Identifizierung von Transformanten. Als Selektionsmarker geeignet sind Gene, die für eine Resistenz gegenüber z. B. Ampicillin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Kanamycin oder andere Antibiotika codieren. Wenn das erfindungsgemäße metA-Allel extrachromosomal repliziert werden soll, sollte der Plasmidvektor vorzugsweise einen Ursprungspunkt der Replikation enthalten. Besonders bevorzugt sind Plasmid-Vektoren wie beispielsweise die E. coli-Vektoren pACYC184, pUC18, pBR322, pSC101 und ihre Derivate. Als induzierbare Promotoren eignen sich beispielsweise der lac-, tac-, trc-, lambda PL, ara- oder tet-Promotor oder davon abgeleitete Sequenzen. Bevorzugt wird die konstitutive Expression von einem GAPDH-Promotor. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung befinden sich die für die Homoserin-Transsuccinylase codierenden Gene unter Kontrolle des GAPDH-Promoters in einem von pACYC184 abgeleiteten Plasmid. Die Strategien zur Integration von Genen in das Chromosom sind Stand der Technik.

Ein geeigneter Wirtsstamm wird mit einem Expressionsvektor, der die für eine L-Methionin- und/oder SAM-insensitive Homoserin-Transsuccinylase codierende Transkriptionseinheit enthält, transformiert. Als Wirtsstämme werden Stämme, die L-Methionin- und/oder SAM-sensitive Proteine enthalten, wie zum Beispiel Bakterien verwendet.

Als Wirtsstamm wird vorzugsweise ein E. coli-Wildtypstamm oder ein Stamm verwendet, in dem das endogene metA-Gen inaktiviert ist, wie z.B. E. coli Stamm DL41, CGSC-Stammsammlung Nr. 7177. Solche Stämme werden durch ein erfindungsgemäßes metA-Gen komplementiert. Die Fähigkeit eines erfindungsgemäßen Stammes zur mikrobiellen Produktion von L-Methionin oder SAM kann durch zusätzliche Maßnahmen verstärkt werden. Beispielsweise können zu diesem Zweck Stämme verwendet werden, in welchen das Gen metJ, welches für einen Repressor der Gene des Methionin-

Stoffwechsels codiert, nicht mehr exprimiert wird
(JP2000139471A).

Die Produktion von L-Methionin oder SAM erfolgt vorzugsweise
5 durch Kultivierung eines erfindungsgemäßen Mikroorganismenstammes. Dazu wird der Mikroorganismenstamm beispielsweise in einem Fermenter in einem Nährmedium kultiviert, das eine geeignete Kohlenstoff-, und eine geeignete Energiequelle, sowie andere Zusatzstoffe enthält.

10 Die während der Fermentation gebildeten Substanzen wie beispielsweise L-Methionin oder SAM können anschließend aufgereinigt werden.

15 Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung. Sämtliche eingesetzten molekularbiologischen Verfahren, wie Polymerase-Kettenreaktion, Isolierung und Reinigung von DNS, Modifikation von DNS durch Restriktionsenzyme, Klenow-Fragment und Ligase, Transformation etc wurden in der
20 dem Fachmann bekannten, in der Literatur beschriebenen oder von den jeweiligen Herstellern empfohlenen Art und Weise durchgeführt.

Beispiel 1:

25 Erzeugung von feedback-resistenten Homoserin-Transsuccinylasen durch ungerichtete Mutagenese des metaA-Strukturgens

Das Gen metaA aus E. coli wurde durch Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung der am 5'-Ende phosphorylierten Oligonukleotide metaAfw mit der Sequenz

30 5'-GATCCCATGGCTCCTTTTAGTCATTCTTAT-3', (SEQ ID No. 3)

und metArev mit der Sequenz

5'-GATCGAGCTCAGTACTATTAATCCAGCGTTGGATTC-3', (SEQ ID No. 4)

als Primer und chromosomaler DNS aus E. coli Stamm W3110 (ATCC
35 27325) als Substrat amplifiziert. Das 1,1 kb lange Produkt wurde elektrophoretisch isoliert und mittels eines QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) gereinigt. Danach wurde es in das Plasmid pBR322 (MBI Fermentas), das mit dem Restriktionsenzym

EcoRI und dem Klenow-Fragment (Roche) behandelt worden war, mittels T4-DNS-Ligase eingefügt. Das entstandene Plasmid pKP438 wurde für die Mutagenese eingesetzt.

5 Plasmid pKP438 wurde durch Transformation in den E. coli-Stamm XL1-Red (Stratagene) eingebracht und durch Kultivierung nach Anleitung des Herstellers wurden Mutationen im Plasmid pKP438 eingeführt. Die Mutagenese erfolgte in Gegenwart von kritischen Konzentrationen von Methionin-Analoga wie in Lawrence
10 D.A. und Smith D.A., Genetics 58: 473-492 (1968) beschrieben. Durch diese Prozedur werden Mutanten selektiert, die eine Methionin-Überproduktion zeigen. Die meisten dieser Mutanten sind auf veränderte, auf dem Plasmid pKP438 codierte Homoserin-Transsuccinylasen zurückzuführen.

15 Die Plasmide aus zwei Mutanten wurden isoliert und die DNS-Sequenz der metA-Gene wurde bestimmt. Es zeigte sich, dass die beiden Gene jeweils im Vergleich zum Wildtyp einen Basenaustausch aufweisen, der zu einer veränderten Aminosäure in der
20 jeweils codierten Homoserin-Transsuccinylase führt. metA in pBR1 enthält als Base 301 ein A statt dem im Wildtyp-Gen vorkommenden G, wodurch im codierten Protein an Position 101 Asparagin statt Aspartat eingebaut wird. pBR3 enthält als Base
25 881 ein G statt dem im Wildtyp-Gen vorkommenden A, wodurch im codierten Protein an Position 294 Cystein statt Tyrosin eingebaut wird.

Beispiel 2:

30 Erzeugung von feedback-resistenten Homoserin-Transsuccinylasen durch gezielte Basenaustausche im metA-Strukturgen

In Beispiel 1 wurden metA-Allele hergestellt, die aufgrund von Basenaustausch und damit einhergehender Aminosäureveränderung an Position 101 beziehungsweise 294 gegenüber L-Methionin
35 und/oder SAM feedback-resistente Homoserin-Transsuccinylasen codieren (siehe Beispiele 3 und 4). Durch ortsspezifische Mutagenese wurden daher Gene konstruiert, die für Homoserin-Transsuccinylasen codieren, in denen entweder die Aminosäure

Aspartat an Position 101 oder die Aminosäure Tyrosin an Position 294 durch verschiedene andere Aminosäuren ersetzt ist und die dadurch veränderte Eigenschaften hinsichtlich der Hemmung ihrer Aktivität durch L-Methionin und SAM aufweisen.

5

Als Basisplasmid für die Konstruktion der erfindungsgemäßen Plasmide wurde das von pACYC184 abgeleitete Plasmid pACYC184-LH verwendet, welches unter der Nummer DSM 10172 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig hinterlegt ist. In dieses Plasmid wurde die Sequenz des GAPDH-Promotors und zusätzlich davor eine NdeI-Schnittstelle durch folgendes Vorgehen eingefügt: Der GAPDH-Promotor wurde durch Polymerase-Kettenreaktion nach den dem Fachmann bekannten Regeln amplifiziert, wobei die Oligonukleotide GAPDHfw mit der Sequenz

15 5'-GTCGACGCGTGAGGCGAGTCAGTCGCGTAATGC-3' (SEQ ID No. 5) und GAPDHrevII mit der Sequenz

5'-GACCTTAATTAAGATCTCATATGTTCCACCAGCTATTTGTTA-3' (SEQ ID No. 6)

20 als Primer und chromosomale DNS aus E. coli Stamm W3110 (ATCC 27325) als Substrat dienten. Das Produkt wurde elektrophoretisch isoliert, mittels eines QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) gereinigt und mit den Restriktionsenzymen MluI und PacI nach Herstellerangaben behandelt. Hierauf wurde es in einen mit den gleichen Enzymen behandelten Vektor pACYC184-LH

25 mit Hilfe von T4-Ligase eingefügt, wodurch das Plasmid pKP290 entstand.

Das Gen metA aus E. coli wird durch Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung der Oligonukleotide metAfw2 mit der Sequenz

30 5'-CATGGCTCCTTTTAGTCATTCTTATATTCTAACGTAG-3', (SEQ ID No. 7) und metArev2 mit der Sequenz

5'-ACGCGTATGCATCCAGAGCTCAGTACTATTAATCCAGCGTTGGATTC-3', (SEQ ID No. 8)

35 als Primer und chromosomaler DNS aus E. coli Stamm W3110 (ATCC 27325) als Substrat amplifiziert. Das 1,1 kb lange Produkt wurde elektrophoretisch aufgetrennt und mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) gereinigt. Danach wurde das Produkt in

den folgendermaßen vorbereiteten Vektor pKP290 ligiert: Behandlung mit Restriktionsenzym NdeI, Klenow-Enzym, Restriktionsenzym BglII und Mung Bean Nuclease (Roche). Das entstandene Plasmid pKP413GAP ist in Fig. 1 dargestellt und unter der Nummer DSM 15221 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig hinterlegt. Es enthält das metA-Gen aus E. coli unter Kontrolle des GAPDH-Promotors und dient als Ausgangsplasmid zur Herstellung der feedback-resistenten metA-Allele.

Plasmid pKP413GAP wurde einer gerichteten ortsspezifischen Mutagenese betreffend Codon 294 des metA-Strukturgens unterzogen. Dazu wurde eine inverse Polymerase-Kettenreaktion mit Pfu-Polymerase (Promega) nach dem Fachmann bekannten Regeln durchgeführt. Als Primer dienten die am 5'-Ende phosphorylierten Oligonukleotide metAmutfw1 mit der Sequenz

5'-NNNCAGATCACGCCATACGATCTAC-3' (SEQ ID No. 9), wobei bei der Synthese für N eine 1:1:1:1 Mischung aus A,T,C,G eingesetzt wurde und metAmutrev1 mit der Sequenz

5'-GACGTAATAGTTGAGCCAGTTGG-3' (SEQ ID No. 10).

Das etwa 4,3 kb große Produkt wurde elektrophoretisch isoliert und mittels eines QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt. Danach erfolgte eine intramolekulare Ligation mit T4-DNS-Ligase nach Herstellerangaben. Die Transformation von E. coli-Zellen des Stammes DH5 α erfolgte nach der CaCl₂-Methode auf dem Fachmann bekannte Art und Weise. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Tetracyclin-Agarplatten (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar, 15 mg/l Tetracyclin) ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gewünschten Transformanten wurden nach einer Plasmidisolierung mittels eines QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) durch eine Restriktionsanalyse identifiziert. Der Bereich zwischen den Schnittstellen Esp3I und ScaI, der das Codon 294 des metA-Strukturgens enthält, wurde sequenziert, isoliert und in ein mit den gleichen Enzymen behandeltes Plasmid pKP413GAP mittels dem Fachmann bekannten Methoden eingefügt.

Für die gerichtete Mutagenese betreffend Codon 101 wurde analog vorgegangen, jedoch wurden als Primer für die Polymerase-Kettenreaktion die Oligonukleotide metAmutfw2 mit der Sequenz 5'-NNNGGTTTGATTGTAAGTGGTGCG-3' (SEQ ID No. 11), wobei bei der Synthese für N eine 1:1:1:1 Mischung aus A,T,C,G eingesetzt wurde, und metAmutrev2 mit der Sequenz

5'-AAAGTTCTGATCCTGAATATC-3' (SEQ ID No. 12)

eingesetzt. Die Plasmide mit im Vergleich zum Wildtyp metA veränderter Position an Codon 101 wurden im Bereich zwischen den Schnittstellen Esp3I und PvuII sequenziert, isoliert und in ein mit den gleichen Enzymen behandeltes Plasmid pKP413GAP eingefügt.

Die so konstruierten Plasmide enthalten das vollständige metA-Gen mit jeweils im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz veränderter Sequenz an Codon 294 beziehungsweise 101, wodurch sie für die Produktion verschiedener Varianten von Homoserin-Transsuccinylasen eingesetzt werden können (Tabelle 1).

Tabelle 1: Ausgangsplasmid sowie Plasmide enthaltend metA-Varianten mit verändertem Codon 101 bzw. 294.

Plasmid	Codon 101	Aminosäure 101	Codon 294	Aminosäure 294
pKP413GAP	GAC	Asp	TAC	Tyr
pKP446	GAC	Asp	TGC	Cys
pSLmetA*L	GAC	Asp	CTC	Leu
pSLmetA*A	GAC	Asp	GCC	Ala
pSLmetA*P	GAC	Asp	CCT	Pro
pSLmetA*Q	GAC	Asp	CAG	Gln
pSLmetA*K	GAC	Asp	AAG	Lys
pSLmetA*0	GAC	Asp	---*)	---*)
pSLmetAN	AAC	Asn	TAC	Tyr
pSLmetAH	CAC	His	TAC	Tyr
pSLmetAC	TGT	Cys	TAC	Tyr

pSLmetAS	AGC	Ser	TAC	Tyr
pSLmetAY	TAC	Tyr	TAC	Tyr
pSLmetAA	GCG	Ala	TAC	Tyr
pSLmetAI	ATC	Ile	TAC	Tyr

*) : Codon 294 fehlt in metA-Sequenz

**) : die Aminosäure 294 ist deletiert

Beispiel 3:

5 Aktivität der Homoserin-Transsuccinylase-Mutanten und Feed-back-Resistenz gegenüber L-Methionin

Die Aktivität und der Einfluss von L-Methionin auf die Aktivität der verschiedenen Homoserin-Transsuccinylasen wurde durch
 10 einen Enzymtest mit Zellextrakten, in denen die jeweiligen Proteine produziert worden waren, bestimmt. Dazu wurden die entsprechenden für veränderte Homoserin-Transsuccinylasen codierenden Plasmide mittels Transformation nach dem Fachmann bekannten Methoden in den E. coli-Stamm W3110 (ATCC 27325)
 15 eingebracht. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Tetracyclin-Agarplatten (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar, 15 mg/l Tetracyclin) ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen Transformanten wurden in SM1-Medium (für 1 l Medium: CaCl₂ x 2 H₂O 0,0147 g,
 20 MgSO₄ x 7 H₂O 0,3 g, Na₂MoO₄ x 2 H₂O 0,15 mg, H₃BO₃ 2,5 mg, CoCl₂ x 6 H₂O 0,7 mg, CuSO₄ x 5 H₂O 0,25 mg, MnCl₂ x 4 H₂O 1,6 mg, ZnSO₄ x 7 H₂O 0,3 mg, KH₂PO₄ 3,0 g, K₂HPO₄ 12,0 g, (NH₄)₂SO₄ 5 g, NaCl 0,6 g, FeSO₄ x 7 H₂O 0,002 g, Na₃-Citrat x 2 H₂O 1g, Glucose 5 g, Trypton 1 g, Hefeextrakt 0,5 g) angezogen, bei
 25 einer Absorption von ca. 0,8 bei 600 nm abzentrifugiert, in 50 mM Tris pH 7,5 gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 50 mM Tris/Cl pH 7,5, 2 mM Dithiothreitol, 0,5 mM Phenyl-Methyl-Sulfonsäurefluorid resuspendiert und in einer French Press aufgebrochen. Der Überstand einer weiteren
 30 Zentrifugation wurde als Enzymextrakt in den Test eingesetzt. Die Enzymaktivität wurde in einem Ansatz mit 50 mM Tris/Cl pH 7,6, 1 mM Homoserin und 0,1 mM Succinyl-CoA bestimmt, indem das bei der Reaktion entstehende Coenzym A über die Abnahme

der Extinktion bei 232 nm photometrisch quantifiziert wurde in Anlehnung an die von Kredich und Tomkins beschriebene Methode zur Bestimmung der Aktivität von Serin-Acetyltransferasen, (Kredich N.M. und Tomkins G.M., J. Biol. Chem. 241, 4955-4965 (1966)). Die Auswirkung von zugesetztem L-Methionin auf die Aktivität wurde bestimmt und die Hemmbarkeit wurde als K_i quantifiziert. Als K_i wird diejenige Konzentration an L-Methionin bestimmt, bei der die Aktivität der Homoserin-Transsuccinylase nur noch 50% der Aktivität in Abwesenheit von L-Methionin beträgt.

Alle Homoserin-Transsuccinylase-Mutanten zeigen eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Feedback-Resistenz hinsichtlich L-Methionin. Tabelle 2 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Tabelle 2: Aktivität des WT-Enzyms sowie der Homoserin-Transsuccinylase-Mutanten und Feedback-Resistenz gegenüber L-Methionin.

Plasmid	Aktivität (U/mg)	Aktivität (%)* in Anwesenheit von 1 mM L-Methionin	K_i L-Methionin (mM)
pKP413GAP	0,155	2	0,05
pKP446	0,133	96	11
pSLmetA*L	0,070	89	6,5
pSLmetA*A	0,063	94	7,5
pSLmetA*P	0,020	91	6
pSLmetA*Q	0,065	95	11
pSLmetA*K	0,048	92	12,5
pSLmetA*O	0,085	98	14,5
pSLmetAN	0,050	86	8
pSLmetAH	0,045	90	12
pSLmetAC	0,084	92	5
pSLmetAS	0,027	89	7,5

pSLmetAY	0,094	93	10
pSLmetAA	0,031	96	6
pSLmetAI	0,107	95	9,5

* Aktivität in Abwesenheit von L-Methionin entspricht 100%.

Beispiel 4:

Feedback-Resistenz der Homoserin-Transsuccinylasen gegenüber SAM

Der Einfluß von SAM auf die Aktivität der verschiedenen Homoserin-Transsuccinylasen wurde durch Quantifizierung der Aktivität in Gegenwart verschiedener SAM-Konzentrationen (Cl-Salz, Sigma) bestimmt. Die Anzucht und Präparation der Zellextrakte erfolgte wie in Beispiel 3 beschrieben. Der Aktivitätstest erfolgte wie in Lee L.W. et al., J. Biol. Chem. 241, 5479-5480 (1966) beschrieben, wobei der Enzymextrakt mit 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5, 3 mM Homoserin und 0,3 mM Succinyl-CoA inkubiert wurde. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden 100 µl Testansatz durch Zugabe zu einem Gemisch aus 400 µl Ethanol, 400 µl Wasser und 100 µl 10 mM 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure) gestoppt. Nachdem der Ansatz 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde, wurde die Absorption bei 412 nm photometrisch bestimmt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten die Enzymaktivität errechnet. Als Maß für die Hemmbarkeit der Aktivität durch SAM wurde der K_i bestimmt.

Tabelle 3: Aktivität der Homoserin-Transsuccinylase-Mutanten und Feedback-Resistenz gegenüber SAM.

Plasmid	Aktivität (U/mg)	Aktivität (%) * in Gegenwart von 1 mM SAM	K_i SAM (mM)
pKP413GAP	0,62	0,5	0,2
pKP446	0,49	92	10

pSLmetA*L	0,29	80	7
pSLmetA*A	0,26	95	10
pSLmetA*P	0,15	98	18
pSLmetA*Q	0,21	87	6
pSLmetA*K	0,14	90	5
pSLmetA*O	0,33	96	10
pSLmetAN	0,30	91	13
pSLmetAH	0,27	93	16
pSLmetAC	0,51	91	7
pSLmetAS	0,15	89	10
pSLmetAY	0,61	95	14
pSLmetAA	0,20	90	8
pSLmetAI	0,68	93	12

* Aktivität in Abwesenheit von SAM entspricht 100%.

Patentansprüche

1. Homoserin-Transsuccinylase, die im Vergleich zu einem Homoserin-Transsuccinylase-Wildtyp-Enzym mindestens eine Mutation aufweist und eine im Vergleich zu dem Wildtyp-Enzym reduzierte Sensitivität gegenüber L-Methionin oder SAM zeigt, wobei das Wildtyp-Enzyms eine Aminosäuresequenz besitzt, die eine Teilsequenz AspGlyXaaXaaXaaThrGlyAlaPro zwischen Position 90 und 115 und eine Teilsequenz TyrGlnXaaThrPro zwischen Position 285 und 310 umfasst, wobei Position 1 der Aminosäuresequenz das Startmethionin ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Mutation ein Aminosäureaustausch des Aspartats in der Teilsequenz AspGlyXaaXaaXaaThrGlyAlaPro, oder ein Aminosäureaustausch des Tyrosins in der Teilsequenz TyrGlnXaaThrPro ist.
2. Homoserin-Transsuccinylase nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine im Vergleich zum Wildtyp zumindest 2-fach erhöhte Resistenz (erhöhter Ki) gegenüber SAM oder L-Methionin aufweist.
3. Homoserin-Transsuccinylase nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine der in Tabelle 1 aufgelisteten Mutationen enthält.
4. MetA-Allel codierend für eine Homoserin-Transsuccinylase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3.
5. Plasmid, dadurch gekennzeichnet, dass es ein metA-Allel gemäß Anspruch 4 mit einem Promotor enthält.
6. Mikroorganismenstamm, dadurch gekennzeichnet, dass er ein feedback-resistentes metA-Allel gemäß Anspruch 4 enthält.

7. Mikroorganismenstamm, gemäß Anspruch 6 dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen gram-negativen Bakterienstamm, vorzugsweise um E. coli handelt.

- 5 8. Verfahren zur Herstellung von L-Methionin oder SAM durch Kultivierung eines Mikroorganismenstammes gemäß Anspruch 6 oder 7.

SEQUENCE LISTING

<110> Consortium fuer elektrochemische Industrie GmbH

<120> Feedback-resistente Homoserin-Transsuccinylasen

<130> CO10217

<140>

<141>

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 930

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (930)

<300>

<301> Blattner, F. R.

<302> The complete genome sequence of Escherichia coli K-12.

<303> Science

<304> 277

<305> 5331

<306> 1453-1474

<307> 1997

5

<400> 1

atg ccg att cgt gtg ccg gac gag cta ccc gcc gtc aat ttc ttg cgt 48

10 Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg

1 5 10 15

15

gaa gaa aac gtc ttt gtg atg aca act tct cgt gcg tct ggt cag gaa 96

Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu

20

20 25 30

25 att cgt cca ctt aag gtt ctg atc ctt aac ctg atg ccg aag aag att 144

Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile

35 40 45

30

gaa act gaa aat cag ttt ctg cgc ctg ctt tca aac tca cct ttg cag 192

35 Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln

50 55 60

40

gtc gat att cag ctg ttg cgc atc gat tcc cgt gaa tcg cgc aac acg 240

Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr

45 65 70 75 80

ccc gca gag cat ctg aac aac ttc tac tgt aac ttt gaa gat att cag 288

50 Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln

85 90 95

55

gat cag aac ttt gac ggt ttg att gta act ggt gcg ccg ctg ggc ctg 336

Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu

60

100

105

110

5 gtg gag ttt aat gat gtc gct tac tgg ccg cag atc aaa cag gtg ctg 384
Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu

115

120

125

10

gag tgg tcg aaa gat cac gtc acc tcg acg ctg ttt gtc tgc tgg gcg 432
15 Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala

130

135

140

20

gta cag gcc gcg ctc aat atc ctc tac ggc att cct aag caa act cgc 480
Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg

25

145

150

155

160

30

acc gaa aaa ctc tct ggc gtt tac gag cat cat att ctc cat cct cat 528
Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His

165

170

175

35

gcg ctt ctg acg cgt ggc ttt gat gat tca ttc ctg gca ccg cat tcg 576
Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser

40

180

185

190

45

cgc tat gct gac ttt ccg gca gcg ttg att cgt gat tac acc gat ctg 624
Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu

195

200

205

50

gaa att ctg gca gag acg gaa gaa ggg gat gca tat ctg ttt gcc agt 672
55 Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser

210

215

220

60

aaa gat aag cgc att gcc ttt gtg acg ggc cat ccc gaa tat gat gcg 720

Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala

5 225 230 235 240

caa acg ctg gcg cag gaa ttt ttc cgc gat gtg gaa gcc gga cta gac 768

10

Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp

245 250 255

15

ccg gat gta ccg tat aac tat ttc ccg cac aat gat ccg caa aat aca 816

20

Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr

260 265 270

25

ccg cga gcg agc tgg cgt agt cac ggt aat tta ctg ttt acc aac tgg 864

Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp

275 280 285

30

ctc aac tat tac gtc tac cag atc acg cca tac gat cta cgg cac atg 912

35

Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met

290 295 300

40

aat cca acg ctg gat taa

930

Asn Pro Thr Leu Asp

45

305 310

50

<210> 2

<211> 309

55

<212> PRT

<213> Escherichia coli

60

<400> 2

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg
5 1 5 10 15

Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu
10 20 25 30

Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile
15 35 40 45

Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln
20 50 55 60

Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr
25 65 70 75 80

Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln
30 85 90 95

Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu
35 100 105 110

Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu
40 115 120 125

Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala
45 130 135 140

Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg
50 145 150 155 160

5 Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His
165 170 175

10 Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser
180 185 190

15 Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu
195 200 205

20 Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser
210 215 220

25 Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala
225 230 235 240

35 Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp
245 250 255

40 Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr
260 265 270

45 Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp
275 280 285

50 Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met
290 295 300

55 Asn Pro Thr Leu Asp
305

5 <210> 3
<211> 30
10 <212> DNA
<213> Artificial Sequence
15 <220>
<223> Description of Artificial Sequence:
20 Oligonukleotid metAfw
<400> 3
25 gatcccatgg ctccttttag tcattcttat 30
30
<210> 4
<211> 36
35 <212> DNA
<213> Artificial Sequence
40
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid
45 metArev
50 <400> 4
gatcgagctc agtactatta atccagcgtt ggatgc 36
55
<210> 5
60 <211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5

<220>

10 <223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid
GAPDHfw

15

<400> 5

gtcgacgcgt gaggcgagtc agtcgcgtaa tgc

33

20

<210> 6

25

<211> 42

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

35

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid

GAPDHrevII

40

<400> 6

45

gaccttaatt aagatctcat atgttcacc agctatttgt ta

42

50

<210> 7

<211> 37

55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

60

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid

5 metAfw2

<400> 7

10 catggctcct tttagtcatt cttatattct aacgtag

37

15

<210> 8

<211> 47

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Oigonukleotid

30

metArev2

35 <400> 8

acgcgtatgc atccagagct cagtactatt aatccagcgt tggattc

47

40

<210> 9

45 <211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

50

<220>

55 <223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid

metAmutfwl

60

<400> 9

nnncagatca cgccatacga tctac

25

5

<210> 10

10

<211> 23

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid

metAmutrev1

25

<400> 10

gacgtaatag ttgagccagt tgg

23

30

35 <210> 11

<211> 24

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

45 <220>

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid

metAmutfw2

50

<400> 11

55 nnnggtttga ttgtaactgg tgcg

24

60

<210> 12

<211> 21

5 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid

15

metAmutrev2

20

<400> 12

aaagttctga tcctgaatat c

Fig. 1: pKP413GAP